

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-511845

(P2002-511845A)

(43) 公表日 平成14年4月16日 (2002.4.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テラード* (参考)
A 6 1 K 49/00		A 6 1 K 49/00	A
C 0 7 D 233/02		C 0 7 D 233/02	
239/94		239/94	
401/12		401/12	
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/09	A
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全102頁)

(21) 出願番号 特願平10-545307
 (86) (22) 出願日 平成10年4月24日 (1998.4.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成11年10月25日 (1999.10.25)
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 8 / 0 1 1 9 7
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 4 7 5 4 1
 (87) 国際公開日 平成10年10月29日 (1998.10.29)
 (31) 優先権主張番号 9 7 0 8 2 6 5 , 5
 (32) 優先日 平成9年4月24日 (1997.4.24)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 ニュコメド・イメーシング・アクシエセル
 カベト
 ノールウエー国エンー0401 オスロ、トル
 ショヴ、ビー・オー・ボックス4220、ニユ
 コヴェイエン1ー2
 (72) 発明者 クラヴェーネス、ユー
 ノールウエー国エンー0401 オスロ、トル
 ショヴ、ビー・オー・ボックス4220、ニユ
 コヴェイエン1ー2、ニユコメド・イメー
 ジング・アクシエセルカベト
 (74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造影剤

(57) 【要約】

式1

V-L-R (I)

(式中、Vは新脈管形成に関連する内皮細胞受容体に対する親和性を有するペプチド部分であり、Lはリンカー部分または結合であり、そしてRは検出可能な部分である)を有する化合物において、Vが非ペプチド性有機基またはペプチド性有機基であり、Rがインビロ造影において検出可能な多数の標識を供給する、高分子物質または粒状物質であることを特徴とする前記化合物を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 式1



(式中、Vは新脈管形成に関連する内皮細胞受容体に対する親和性を有するベクター部分であり、Lはリンカー部分または結合体であり、そしてRは検出可能な部分である)を有する化合物において、Vが非ペプチド性有機基またはペプチド性有機基であり、Rがインビボ造影において検出可能な多数の標識を供給する、高分子物質または粒状物質であることを特徴とする、前記化合物。

2. Vが非ペプチド性有機部分である、請求項1記載の化合物。
3. Vがペプチドまたはペプチド部分である、請求項1記載の化合物。
4. Vがインテグリン受容体に対するベクターである、請求項1記載の化合物。
5. Vがフィブロネクチン受容体に対するベクターである、請求項1記載の化合物。
6. VがVEGF受容体に対するベクターである、請求項1記載の化合物。
7. Vがウロキナーゼプラスミノゲン活性化物質受容体に対するベクターである、請求項1記載の化合物。
8. Vが、

N^2 - [3S-ヒドロキシ-4-(N-ヒドロキシアミノ)2R-イソブチルスクシニル] - L - (4-オキシメチルカルボキシ)フェニルアラニン - N^1 - メチルアミド、

N - (4-オクチルフェニル) - 3 - (2-カルボキシエチル) - 6,7-ジヒドロ-5H-チアゾロ[3,2-a]ピリミジン - 2 - カルボキサミド、

N^2 - [3S-ヒドロキシ-4-ヒドロキシアミノ] - 2R-イソブチルスクシニル] - L - フェニルアラニン - N^1 - メチルアミド、

塩酸N - [6-アミノヘキシル] - [4-(6,7-ジメトキシキナゾリン-4-イルアミノ)フェニル]アセトアミド、

3-オキソ-2-[2-(ピリジン-2-イルアミノ)-エチル]-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-5-カルボン酸[2-(2-アミノ-エチルカ

ルバモイル)ーエチルーアミド、および Nー(6ーアミノーヘキシル)ー2ー{3ー[2ー(4ークロロベンジルオキシ)ー2ー(2,4ージクロロフェニル)ーエチル]ー3Hーイミダゾールー1ーイル]ーアセトアミド

からなるベクター部分のリストから選択される、請求項1記載の化合物。

9. VーLーRが、下記の残基

Gd(III)、^{99m}Tc、または請求項8記載のベクター部分のDTPA誘導体の¹¹¹In キレート

化合物から選択される、請求項1記載の化合物。

10. Rが放射性ヌクレオチドである、請求項1〜8のいずれか1項記載の化合物。

11. Rがヨウ素または金属放射性ヌクレオチドである、請求項10記載の化合物。

12. 請求項1〜11のいずれか一項記載の式Iの化合物を少なくとも1種の製薬上許容しうる担体または賦形剤とともに含有する医薬組成物。

13. 造影剤を被検者に投与し、その被検者のすくなくとも身体の一部の像を形成させることからなる、診断法に使用するための造影剤の製造への請求項1〜11のいずれか一項記載の式Iの化合物の使用。

14. 造影剤として請求項1〜11のいずれか一項記載の式Iの化合物を用いることを特徴とする、造影剤を被検者に投与し、造影剤が分配されている被検者のすくなくとも身体の一部の像を形成させることからなる、ヒトまたはヒト以外の動物に像を形成する方法。

15. 新脈管形成に関連する作用を抑制または誘起する薬剤を用いてヒトまたはヒト以外の動物の治療効果をモニターする方法において、請求項1〜11のいずれか一項記載の式Iの化合物を被験者に投与し、新脈管形成に関連する内皮細胞受容体により造影剤の取り込みを検出することからなり、そして前記投与および検出が随意に、しかし好適には繰り返し、例えば前記薬剤による治療の前後およびその間に実施される、前記モニター法。

16. 新脈管形成に関連する内皮細胞受容体に対する結合親和性を有する有機化合物(i)を診断造影法で検出する化合物またはキラント化合物(ii)にコンジ

ュゲートし、そして必要により、得られたコンジュゲートのキラント基を診断造影法で検出する金属イオンで金属化することからなる、請求項1～11のいずれか一項記載の式Iを有する化合物の製造法。

【発明の詳細な説明】

造影剤

本発明は、標的造影剤を用いて病気の状態をイメージさせ得る診断造影技術およびそのような技術に適する標的造影剤に関する。より特定的には、本発明は、標的ペクターが新脈管形成に関連する受容体に結合する、そのような造影剤の使用に関する。従って、そのような造影剤は、例えば悪性疾患、心臓病、炎症関連疾患、リュウマチ性関節炎およびカポジ肉腫の診断に使用することができる。さらにそのような薬剤は、これらの疾病の治療上の処置に使用することができる。

新しい血管は、二つの異なる機構：脈管形成または新脈管形成により形成される。新脈管形成は、既存の血管からの枝分かれによる新しい血管の形成である。この過程に対する主な刺激は、組織中の細胞への栄養および酸素の不十分な供給（低酸素症）でありうる。細胞は、1例としては度々引用する血管内皮増殖因子（VEGF）であるが、多数存在する脈管形成因子の分泌に応答しうる。これらの因子は、基底膜のタンパク質を崩壊させるタンパク質分解酵素と同時にこれらの潜在的に有害な酵素の作用を制限する阻害剤の分泌を開始させる。脈管形成因子の他の顕著な作用は、内皮細胞の移動および分裂を引き起こすことである。基底膜に結合し、反対側において血管の廻りに連続シートを形成する内皮細胞は細胞分裂しない。結合の喪失および脈管形成因子の受容体からのシグナルを組み合わせた効果は、内皮細胞を移動させ、増殖させ、そして転移させ、最終的に新たな血管の周りに基底膜を合成させる。

新脈管形成は、傷の回復および炎症過程を包含する組織の成長および再形成において顕著である。腫瘍は、ミリメートルの大きさに達したとき、その成長速度を維持するために新脈管形成を開始させる。新脈管形成が内皮細胞およびその周辺における特有の変化に付随して起こるために、その過程は治療的介入にとって有望な標的である。新脈管形成の阻害は、抗腫

瘍治療に対する有望な戦略とも考えられる。新脈管形成を伴う形質転換はまた、診断において非常に有望であり、明らかな例が悪性疾患であるが、しかしその概念は炎症、およびアテローム性動脈硬化症、脈管形成因子の潜在的源であるマク

ロファージの初期のアテローム硬化による損傷を包含する多くの炎症に関連する疾患に対して大きな期待を示す。これらの因子はまた、狭窄が短時間内に開放される場合に起こる心筋の梗塞部分の再脈管形成にも関与する。

新脈管形成は、内皮細胞に特有の受容体を包含する。これらの細胞の表面は移動の準備のために再形成され、タンパク質分解の達成および制御に関連する多くのタンパク質に加えて、隠された構造は基底膜が減少するときに曝される。新脈管形成に関連する多くの公知の受容体／標的を下記の表1に列記する。腫瘍の場合、生じる血管の網状組織は、著しいよれの形成、さらに動静脈シャントを伴い、通常は組織を破壊する。本明細書において記載する標的方法を使用すると、医学において使用される大部分の造影法によって新脈管形成を検出することができる。

表1—新脈管形成に関連する受容体／標的

標的／受容体

α_2 -抗プラスミン

基底膜成分

塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)

ビグリカン (デルマトン硫酸プロテオグリカン)

軟骨由来阻害剤 [阻害剤]

CD 34

I、IV、VI、VII型コラーゲン

デコリン (デルマトン硫酸プロテオグリカン)

デルマトン硫酸プロテオグリカン

エンドゲリン

エンドシアリン

エンドセリン

上皮成長因子（ヘパリン結合性）

フィブリン

フィブリノペプチドB

繊維芽細胞増殖因子、FGF-3、塩基性

フィブロネクチン

Flt-1/KDR、Flt-4（VEGF受容体）

FLT-1（*fas*様チロシンキナーゼ）（VEGF-A受容体）

ヘパラン硫酸

肝細胞成長因子

肝細胞成長因子受容体（*c-met*）

ヒアルロナン

インスリン様成長因子

インスリン様成長因子/マンノース-6-ホスフェート受容体

インテグリン： β_3 および β_5 、インテグリン $\alpha_5\beta_3$ 、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ （ラミニン受容体）、インテグリン α_6 、インテグリン β_1 、インテグリン $\alpha_2\beta_1$ 、インテグリン α_5 （フィブロネクチン受容体のサブユニット）、インテグリン $\alpha_5\beta_3$ 、フィブリン受容体

インターフェロン α 、 β [阻害剤]

インターロイキン：IL-8、IL-12 [阻害剤]

Jagged遺伝子産物

ラミニン

ラミニン断片

白血病阻害因子

Ly-6（リンパ球活性化タンパク質）

基質メタロプロテアーゼ-2

メタロプロテイナーゼ

メタロプロテイナーゼ阻害剤

MHCクラスII

Notch遺伝子産物

胎盤性成長因子

胎盤性プロリフェリン関連タンパク質

プラスミノーゲン

プラスミノーゲン活性化物質

プラスミノーゲン活性化物質阻害剤-1

プラスミノーゲン活性化物質受容体

血小板由来増殖因子(例えば、BB型)

血小板由来内皮細胞成長因子

血小板因子4〔阻害剤〕

ブレイオトロフィン

プロリフェリン、プロリフェリン関連タンパク質

受容体チロシンキナーゼ

セレクチン：E-セレクチン

SPARC

ストレスタンパク質(分子状カルペロン[charperones])(グルコース調節、ヒートショックファミリー)

シンデカン

メタロプロテイナーゼの組織阻害剤(例えば、TIMP-2)

トロンビン

トロンビン受容体活性化テトラデカペプチド

トロンボスポンジン〔阻害剤〕

TIE受容体(Ig様ドメインおよびEGF様ドメインを有するチロシンキナーゼ)

組織因子

トランスフォーミング増殖因子 α 、 β 腫瘍増殖因子 α

腫瘍壊死因子

ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化物質受容体

血管内皮増殖因子 α

血管内皮増殖因子関連タンパク質

血管内皮増殖因子 α 受容体

ビトロネクチン

フォンビルブラント因子

注：細胞表面の受容体に結合する多くのホルモン、増殖因子および他の化合物は、その受容体に結合することによりベクターとして作用し得るか、または細胞表面に既に結合されている場合、それらに結合するベクター、例えば抗体に対する標的である。

上記のように、多くの望ましくない状態は、新たな血管の発達および増殖である新たな脈管形成または新脈管形成に関連する。そのような状態の例を下記の表2に列記する。

表2—新脈管形成に関連する疾病および適応症

疾病／適応症

動静脈奇形

星状細胞腫

アテローム性動脈硬化症

乳癌

絨毛癌

結腸直腸癌

歯肉炎

膠芽腫
神經膠腫
血管腫（小兒、毛細血管）
肝臓癌
増殖性子宮内膜炎（例えば慢性）
虚血性心筋
カボジ肉腫
肺癌
黄斑変性
黒色腫
転移
神経芽細胞腫
閉塞性末梢動脈疾患
変形性関節症
卵巣癌
脾臓癌
前立腺癌
乾癬
網膜症（糖尿病性、増殖性）
リウマチ性動脈炎
強皮症
セミノーマ
皮膚癌
固形腫瘍形成
潰瘍性大腸炎

このような新たな血管の表面細胞、つまり内皮細胞では、例えば受容体チロシンキナーゼ(RTK)のような種々の表面または膜貫通受容体が通常の濃度より遥かに大きく、新脈管形成の中心を検出する手段として、そのような受容体に対して放射線標識もしくは発色標識した抗体、または同様に標識したそのような受容体

に対する天然タンパク質リガンドの類似体の使用が提案されている（例えばWO 95/26364(Orion)、WO 96/30046 (Genetech) およびWO 95/12414(Repligen)参照）。

しかしながら、ペプチド性リガンドは、検出可能な標識（レポーター）に対する結合部位が相対的に少なく、そのようなペプチド性リガンドにおける多くの部位でのレポーターの結合は、リガンドがとりうるコンホメーションに影響する。ペプチドに伴うさらなる問題は、それらがインビボで不安定なことである。

従って、新脈管形成に関連する受容体に親和性を有する有効な標的造影剤が必要とされる。

本発明は、二つの方法—第一に非ペプチド性リガンド（ベクター）に基づく標的造影剤を提供する、そして第二に非常に多数の検出可能な標識を供給する高分子または粒状レポーター（複数レポーター）に基づく標的造影剤を提供することによって、この必要性に取り組むものである。

従って、一つの態様として、本発明は、式 I



（式中、Vは新脈管形成に関連する内皮細胞の受容体に親和性を有するベクター部分であり、Lはリンカー部分または結合であり、そしてRは、例えばヒトまたは血管新生したヒト以外の動物（例えば、哺乳類、鳥類または虫類）の身体のインビボ造影のような造影法において検出可能である、検出可能なレポーター部分、好ましくは気体を含まない検出可能なレポーター部分である）

を有する化合物を提供するものであり、Vが非ペプチド性有機基であるか、

またはVがペプチド性であり、且つRがインビボ造影において検出可能な多数の標識を供給する高分子もしくは粒状物質であることを特徴とする。

Rが多数の標識を供給する高分子物質である場合、これらは別個に検出可能な標識（例えば常磁性または放射性物質）であるかまたは相互作用、例えば協同磁気現象の作用により検出可能な物質を生成しうるものである。この様な複数レポーターの例には、ポリキレート並びにポリイオン物質、および強磁性体、フェリ磁性体並びに超常磁性体粒子が含まれる。

多くの例において、式Iの化合物は特定化可能な化合物である。他方、結合、さもなくば互いに会合、例えば接合した化合物の組み合わせとすることができる。便宜上、化合物を以下、薬剤と称する。

「気体」とは、37℃において気体である物質または物質の混合物を意味する。「気体を含まない」とは、インビボにおける超音波診断において検出可能であるような十分な気体を含まないレポーターを意味する。気体含有レポーターを含む造影剤は、1997年10月28日出願の本出願人の同時係属の国際特許出願第PCT/GB 97/02958に記載されている。

別の態様により、本発明は、式Iの薬剤の有効量（例えば、インビボ造影において、造影を強化するのに有効な量）を少なくとも1種の製薬上有効な担体または賦形剤と共に含む医薬組成物を提供する。

さらに別の態様によると、本発明は、造影剤を被検者に投与し、前記被検者の少なくとも身体の一部の画像を形成させることからなる診断方法において使用する前記造影剤の製造における式Iの薬剤の使用に関する。

さらにまた別の態様によると、本発明は、造影剤を被検者の、例えば血管系または胃腸管に投与し、前記造影剤が分配した前記被検者の少なくとも身体の一部の画像を、例えばX線、MR、超音波、シンチグラフィ、PET、SPECT、電気インピーダンス、光学または磁気測定画像法で形成させることからなる、前記造影剤として式Iの薬剤を使用することを特徴とする、ヒトまたはヒト以外の動物（好ましくは哺乳類または鳥類）の画像の

形成法を提供する。

さらに別の態様によると、本発明は、新脈管形成に伴う状態を克服するための薬物、例えば細胞毒剤を用いたヒトまたはヒト以外の動物の治療の効果をモニターする方法を提供し、前記方法は、式Iの薬剤を前記被検者に投与し、内皮細胞受容体、特に新脈管形成の領域の受容体による前記薬剤の取り込みを検出することからなり、前記投与および検出は、任意にしかし繰り返し、例えば前記薬剤を用いる治療の前、その間およびその後達成されることが好ましい。

さらにまた別の態様によると、本発明は、式Iの薬剤の調製方法を提供し、前

記方法は、新脈管形成に関連する内皮細胞受容体に対する結合親和性を有する化合物(i)を、診断造影法において検出可能な化合物またはキレート化合物(ii)にコンジュゲートさせ、必要により、得られたコンジュゲート中のキラント基を診断造影法において検出可能な金属イオンを用いて金属化する。

式Iの薬剤は、三つの特徴的な成分：ベクター（V）、リンカー（L）およびレポーター（R）を有する。ベクターは新脈管形成の領域に対する化合物を標的とする能力を有していなければならない、レポーターはインビボ診断造影法において検出可能でなければならない、そしてリンカーはベクターとレポーターとを、少なくともレポーターが新脈管形成の領域に到達するまで、好ましくは造影法が完了するまで、連結させなければならない。

ベクター

ベクターとしては、新脈管形成に関連する受容体に対して親和性を有する、任意のペプチド性、より好ましくは非ペプチド性化合物を用いることができる。

ペプチド性ベクターが一般的に生物学的安定性に乏しく、身体による望ましくない応答を引き起こすために、非ペプチド性化合物を用いるのが好ましい。

ベクターは、何れの許容し得ない生物学的応答を引き起こさない化合物、特に実質的に新脈管形成を促進しないものが好ましい。

ベクターは、新脈管形成の阻害剤であるのが特に好ましく、特に非ペプチド性新脈管形成阻害剤であるのが好ましい。

非ペプチド性新脈管形成阻害剤の例は、WO 94/17084 (British Biotech)、EP-A-618208 (Daichi)、WO 94/13277 (ICRT)、WO 95/06473 (Nippon Kayaku)、WO 94/21612 (Orsuka)、WO 97/37655 (Merck)、WO 97/30035 (Zeneca)、EP-A-678296 (Tsumura)、WO 94/18967 (Harvard)、WO 95/08327 (Dept. of Health and Human Services) (US-A-4590201 (Merck) をも参照) および EP-A-652000 (Eli Lilly) に記載されている。

ペプチド性新脈管形成阻害剤の例は、WO 94/02446 (British Biotech)、WO 94/02447 (British Biotech)、WO 94/21625 (British Biotech)、WO 94/24140 (British Biotech)、WO 95/04033 (Celltech)、EP-A-589719 (Eli Lilly)

、US-A-5399667 (Frazier)、EP-A-241830 (The General Hospital Corporation)
) およびW097/38009 (Merck)に記載されている。

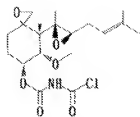
開発中の特定の新脈管形成阻害剤には下記の表3に挙げたものがある：

表3—新脈管形成阻害剤

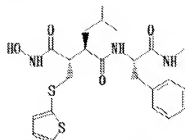
<u>化合物</u>	<u>標的適応症</u>	<u>会社名</u>	<u>注</u>
テコガランナトリウム (Tecogan sodium)	カボジ肉腫 固形腫瘍	Daiichi	硫酸化多糖類 ペプチドグリ カン複合体
AGW-1470	カボジ肉腫 悪性腫瘍	Takeda/Abbott	フマグリ類似 体
CW101	癌転移	Carbomed	多糖類毒素
ミトフラクソン (Mitoflaxone)	固形腫瘍	Lipha	

化合物	標的適応症	会社名	注
GM-1503		Glycomed	修飾ヘパリン
rPP4	カボジ肉腫 結腸癌 神経膠腫 腎細胞癌 悪性黒色腫	Replistatin Repligen	組換えヒト血小板因子-4
MPP-4		Lilly	修飾ヒト血小板因子-4
組換えアンジオ スタチン		EntreMed	
エンドスタチン			コラーゲン断片
サリドマイド	脳腫瘍、乳癌 及び前立腺癌	EntreMed	
DC10		ImClone Systems	モノクローナル抗体
OLX-514	固形腫瘍 敗血症	Aronex	
ラロキシフェン塩 酸塩(Raloxifene hydrochloride)		Lilly	
スラミンナトリウ ム (Suramin sodium)	転移性ホルモン- 難治性前立腺癌		
IL-12	腎臓癌	Roche	
マリマスタット (Marimastat)	脾臓癌、肺癌 および脳腫瘍	British Biotech	
CAI	広範囲の癌	NCI	Caチャネルブロッカー

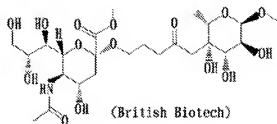
並びに下記のペプチド系および非ペプチド系医薬化合物：



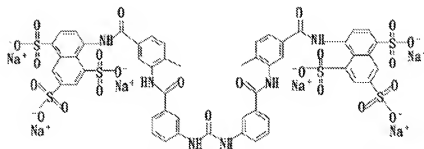
AGW-1470, TNP-470
(Takeda, TAP)



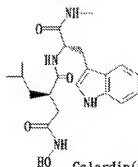
Batimastat(British Biotech)



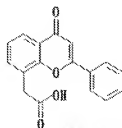
(British Biotech)



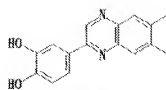
Suramin sodium(Parke-Davis)



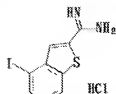
Galardin(Glycomed)



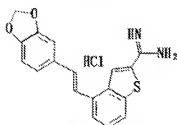
Mitoflaxone(lipha)



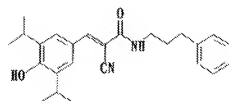
SU1433



B-428(Eisai)[uPA inhibitor]



B-623(Eisai)[uPA inhibitor]



SU1498

新脈管形成領域を標的とし得る他の既知の化合物は下記の表4に挙げる:

表4 新脈管形成に関連する受容体への既知の親和性を有する
ベクター分子

ベクター分子

アンジオボイエチン

アンジオスタチン [プラスミノーゲン断片] [阻害剤]

アンジオテンシンII

α_2 -抗プラスミン

組合わせライブラリー、例えば分解後、基底膜に結合する化合物からの化合物

β -シクロデキストリンテトラデカスルフェート

エンドグリン

エンドシアリン

エンドスタチン [コラーゲン断片]

上皮成長因子 (ヘパリン結合性)

フィブリン

フィブリノペプチドB

繊維芽細胞増殖因子、FGF-3、塩基性

フィブロネクチン

フマギリンおよび類縁体

ヘパリン

肝細胞成長因子

ヒアルロナン

インスリン様成長因子

インターフェロン α 、 β [阻害剤]

インターロイキン：IL-8、IL-12 [阻害剤]

ラミニン、ラミニン断片

白血病阻害因子

リノミド

基質メタロプロテイナーゼ-2

メタロプロテイナーゼ

メタロプロテイナーゼ阻害剤

モノクローナル抗体

例えば：脈管形成因子またはそれらの受容体に対する、または
フィブリン溶解性の系の成分に対する

ペプチド：例えば、環状RGDDFY

胎盤性成長因子

胎盤性プロリフェリン関連タンパク質

プラスミノゲン

プラスミノゲン活性化物質

プラスミノゲン活性化物質阻害剤-1

血小板活性化因子アンタゴニスト [阻害剤]

血小板由来増殖因子（例えば、BB型）

血小板由来増殖因子受容体

血小板由来内皮細胞成長因子

ブレイオトロフィン

ブロリフェリン、ブロリフェリン関連タンパク質

セレクトチン：E-セレクトチン

SPARC

ヘビ毒（RGD-含有）

サブスタンスP（ニューロペプチド：ニューロキニン）

スラミン

金属プロテイナーゼの組織阻害剤（例えば、TIMP-2）

サリドマイド

トロンビン

トロンビン受容体活性化テトラデカペプチド

トランスフォーミング増殖因子 α 、 β

トランスフォーミング増殖因子受容体

腫瘍増殖因子- α

腫瘍壊死因子

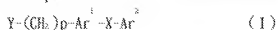
ビトロネクチン

注：細胞表面の受容体に結合する多くのホルモン、増殖因子および他の化合物は、その受容体に結合することによりベクターとして作用し得るか、または細胞表面に既に結合されている場合に、それらに結合するベクター、例えば抗体に対する標的である。

同様に、W0 95/08327に記載されている化合物をベクターとして使用することができる（Kohn等、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92:1307-1311(1995)およびJ. Clin. Oncol. 15:1985-1993(1997)も参照）。

上記の特許刊行物のいくつかに記載されているベクター化合物の特定の例は以下の通りである。

W0 95/08327 (Dept. of Health and Human Services) は式I



式中、

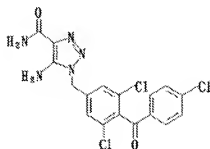
Ar^1 および Ar^2 は芳香族基であり、そしてこれらは相異なるかまたは同一であって
もよく；そしてXは連結基、例えば、O、S、 SO_2 、CO、CHCN、アルキル、ア
ルコキシまたはアルコシアルキルである、

および式II



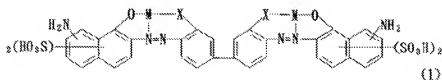
式中、

AはNまたはCH； R^1 はH、 $-\text{CONH}$ 、 $-\text{CONHR}^5$ 、 COOH 、 $-\text{COOR}^5$ 、 SO_2NH_2 ； R^2 はH、 NH_2 、 NHCOPh 、 $-\text{NHCOR}^5$ 、 $-\text{NHCHO}$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)_2$ ；および R^5 は1～6個の炭素有するアルキル、例えば、



を有する新脈管形成阻害剤化合物を記載している。

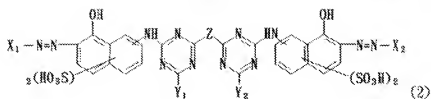
WO 95/06473 (Nippon Kayaku Kabushiki Kasai) は式1



式中、

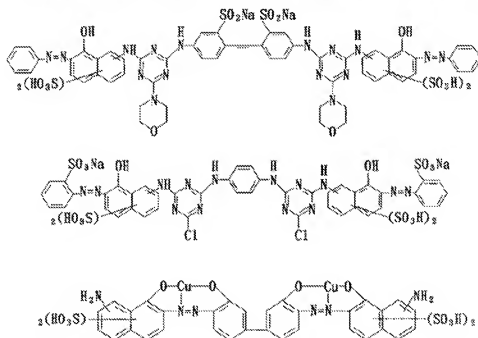
XはO、COOであり；そしてMは遷移金属である、

および式2



式中、

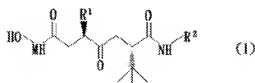
X_1 および X_2 は置換もしくは未置換のフェニルまたはナフチル基であり； Y_1 および Y_2 はハロゲン原子、アミノ基またはモノもしくはジ置換のアミノ基であり；そして Z は NHC_6H_4NH または置換もしくは未置換の芳香族ジアミン残基、例えば、



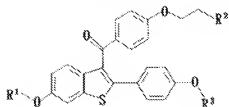
を有する抗腫瘍および新脈管形成阻害剤化合物を開示している。

WO 95/04033 (Celltech Limited) は下記の新脈管形成阻害剤を開示している

：

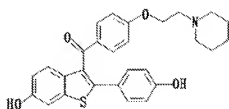


式中、 R は



式中、

R^1 および R^3 は H、Me、 $-C(O)(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-C(O)Ar$ であり；Ar は場合により置換されたフェニルであり；そして R^2 はピロリジノまたはピペリジノ、例えば、



である。

EP 652000 [589719?] (Eli Lilly and Company) は下記のアミノ酸配列を有する修飾血小板因子 4 を開示している。

MPF-4

NH₂-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg-His-Ile-Thr-Ser-Leu-Glu-Val-Ile-Lys-
Ala-Gly-Pro-His-Cys-Pro-Thr-Ala-Gln-Leu-Ile-Ala-Thr-Leu-Lys-Asn-
Gly-Arg-Lys-Ile-Cys-Leu-Asp-Leu-Gln-Ala-Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-
Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-COOH

CPF-4

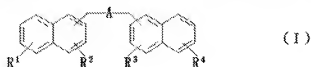
NH₂-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg-His-Ile-Thr-Ser-Leu-Glu-Val-Ile-Lys-
-Ala-Gly-Pro-His-Cys-Pro-Thr-Ala-Gln-Leu-Ile-Ala-Thr-Leu-Lys-Asn-
Gly-Arg-Lys-Ile-Cys-Leu-Asp-Leu-Gln-Ala-Pro-Leu-Tyr-Lys-Ile-Ile-
Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-COOH

これは、

NH₂-Glu-Ala-Glu-Glu-Asp-Gly-Asp-Leu-Gln-Cys-Leu-Cys-Val-Lys-Thr-Thr-CO
OH のアミノ酸配列を有する第二タンパク質とジスルフィド結合している。MPF-
4 の Cys-20 と第二タンパク質の Cys-10 との間および MPF-4 の Cys-36 と第二タ

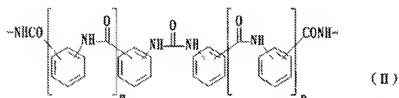
ンパク質のCys-12との間にはジスルフィド橋がある。

WQ 94/13277 (Imperial Cancer Research Technology Limited) は式 I



式中、

R^1 から R^4 は各々独立して $-X$ 、 NO_2 、 $-NO_2$ 、ハロ、トリフルオロメチル、 R^5 、 OR^5 、 $-CH_2OR^5$ 、 $OCOR^5$ 、 $-CH_2OCOR^5$ 、 $-NHCOR^5$ 、 $-CH_2OCOR^5$ 、 $-NHCOR^5$ 、 $-CH_2NHCOR^5$ 、 $-NR^5R^5$ 、 $-CH_2NR^5R^5$ 、 $-CH_2NO_2$ 、 $CONR^5R^5$ 、 $CH_2CONR^5R^5$ 、 $-COOR^5$ 、 $-CH_2COOR^5$ 、 $-CHO$ および CH_2CHO の一個またはそれ以上であり；そして $-X$ は独立して $-SO_2R^5$ 、 $-CH_2PO_2R^5$ 、 R^5R^5 、 $-CH_2SO_2R^5$ 、 $-OSO_2R^5$ 、 $-CH_2OSO_2R^5$ 、 $-NHSO_2R^5$ 、 $-CH_2NHSO_2R^5$ 、 $-OPO_2R^5R^5$ 、 $-CH_2OPO_2R^5R^5$ および $-PO_2R^5R^5$ （ここで、 R^5 および R^5 は独立して $-H$ および低級アルキルから選択される）であり、 A はナフチル基に直接結合する少なくとも 5 個で 30 個以下の結合を含む化学基である（但し、(i) この化合物はスラミンではなく、(ii) A が

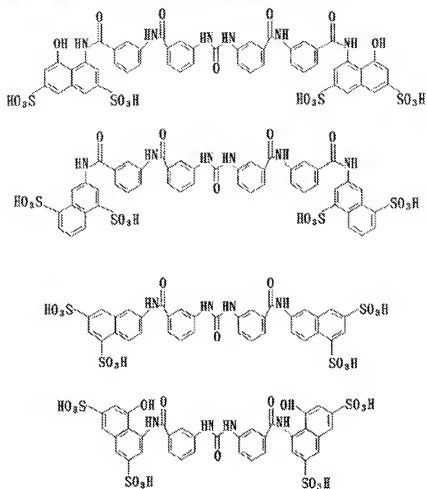


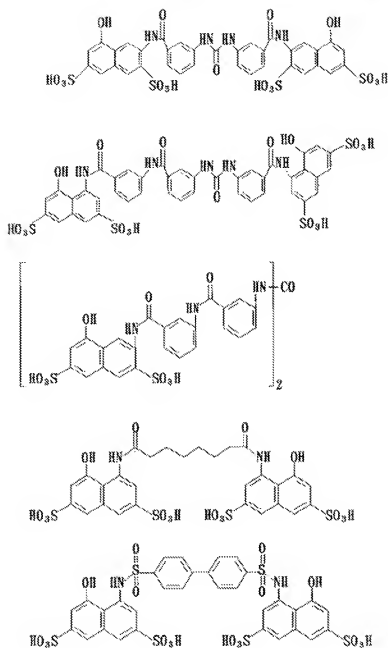
（式中、 m および n は独立して 0、または 2 である）ではない場合、 R^1 から R^4 の少なくとも一個は $-OH$ または酸性基である）の化合物、およびその

製造上許容し得る塩、エステル、そのようなエステルの塩またはそのような化合物のアミドの使用を開示している。

また、 A のナフチル環への結合がアミドまたはスルホンアミド基を介する化合物も記載されている。さらに、 A が式 I の基であり得る場合もある。 A はまた直鎖状または分枝鎖状のアルキル基、アリール基、アルキルアリール基、脂肪族ジカルボン酸、ポリエンおよびそれらの誘導体ならびにポリオールおよびその誘

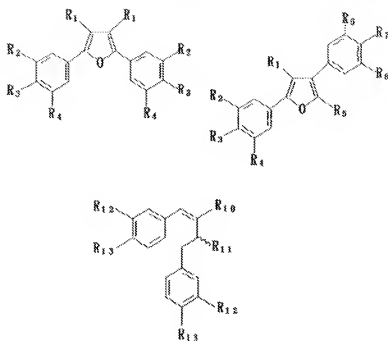
導体から選択し得る。さらにいくつかの化合物は下記の式



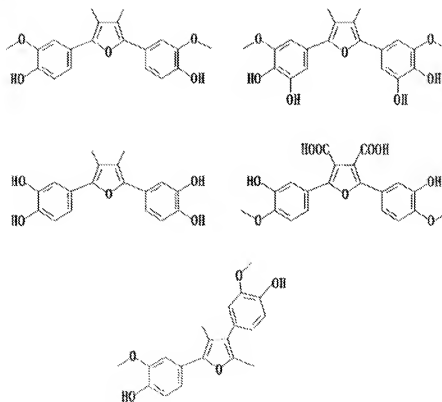


を有する。

EP 678296 (Tsumura & Co.) は一般式



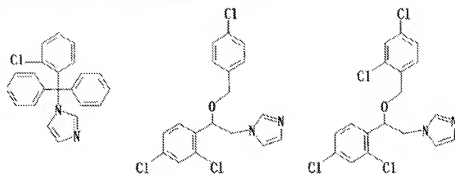
例えば、



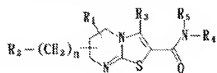
を有する新脈管形成阻害剤を開示している。

WO 94/18967 (President and Fellows of Harvard College) は新脈管形成を

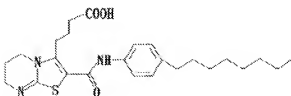
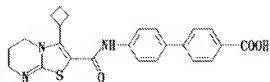
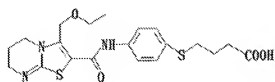
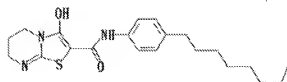
阻害するイミダゾールの種類を開示している。



EP-A-618208 (Daiichi Pharmaceutical) は式

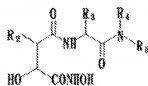


例えば、

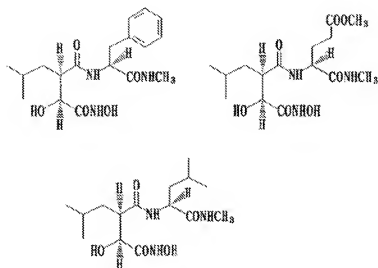


の化合物を開示している。

WO 94/02446 (British Biotechnology Limited) は式

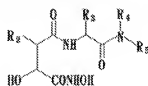


例えば、

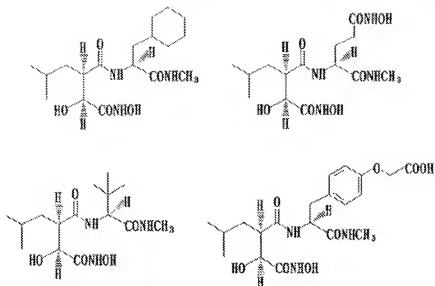


の化合物を開示している。

WO 94/02447 (British Biotechnology Limited) は式

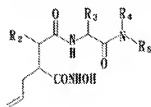


例えば、

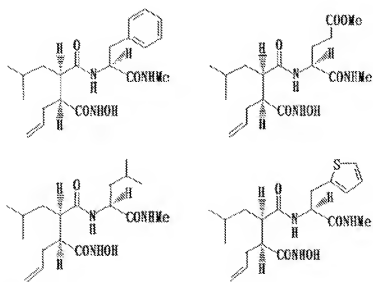


の化合物を開示している。

WO 94/21625 (British Biotechnology Limited) は式

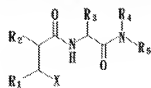


例えば、



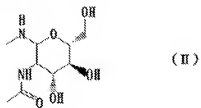
の化合物を開示している。

WO 94/24149(British Biotechnology Limited)は式(1)

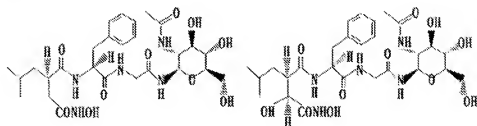


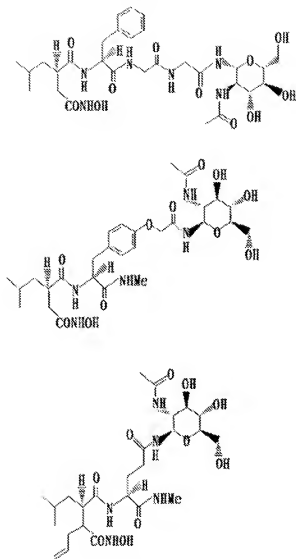
式中、

Xは-CONHOHまたはCOOHであり、式(II)



例えば、





を有する基の置換基³ および／またはR⁴ の存在を主に特徴とする、
の化合物を開示している。

ここで言及されたすべての刊行物の内容は参照により本明細書中に組み込まれる。

特に好ましいペクターは、WO 94/02446に記載されているようなアミノ酸誘導体、WO 94/02447に記載されているようなヒドロキサム酸誘導体、EP-A-618208に記載されているようなチアゾピリミジン、WO 95/08327に記載されているようなトリアゾール、WO97/30035に記載されているよう

なキナザリン、WO 97/37655に記載されているようなイソインドロン、インテグ

リン阻害剤、VEGFアンタゴニスト、bFGFアンタゴニスト、トロンボスポンジン並びにトロンボスポンジン断片、CD 36および増殖因子(例えばVEGF、bFGFなど)を包含する。

CAM-Dおよび上述した他の候補の特定並びに評価技術もまた、候補のペプチド性および非ペプチド性ベクターを特定および評価するのに使用することができる。

従って、分子ライブラリーを直接スクリーニングすることによって、新脈管形成に関連する受容体に特異的に結合する分子を得ることも可能である。ペプチドライブラリーのスクリーニングもまた、慣用または組合わせの化学により生成され得る非ペプチド性アナログの一般的に有効なペプチド構造を特定するために使用することができる。この方法において特定された結合部分は、任意のベクター分子のレポーターへの結合に対する一般的手段を構成する、リンカー分子と連結させることができる。

ベクター分子は、正確な分子標的を知ることを必ずしも必要とせずに、造影すべき領域／構造に結合する分子の機能的選択（インビトロ、生体外またはインビボ）によって、組み合わせライブラリーから生成させることができる。

上述のように、式Iの薬剤は、ベクター、リンカーおよびレポーター部分からなる。一つのリンカー部分は、一つのベクターを一つのレポーターと連結させることができ；また、一つ以上のベクターおよび／または一つ以上のレポーターと一緒に連結させることができる。同様に、レポーターまたはベクターを、一つ以上のリンカーと連結させることができる。この方法における複数のレポーター（例えば、一つのベクターに結合した幾つかのリンカーレポーター部分またはそれ自身一つのベクターと結合した一つのリンカーと結合した幾つかのレポーター）の使用は、造影剤の検出能の向上を可能にし得るか（例えば、その放射線不透過性、エコー発生ま

たは緩和性を増加させることにより）、または一つ以上の造影法において検出を可能にすることができる。この方法における複数のベクターの使用は、造影剤の標的効率を増加させ得るかまたは造影剤を一つ以上の部位、例えば受容体異質性

を有する薬剤に対する異なる受容体を標的とすることができるように得る。故に、例えば式Iの薬剤は、新脈管形成に関連する受容体以外の親和性部位を有する、例えば身体の管路の壁面における細胞表面に親和性を有するベクター部分を包含することができる。従って、薬剤は、抗体断片およびオリゴペプチドのような、例えばRGDもしくは類似の細胞表面結合ペプチドモチーフであるベクター(例えば、EP-A-422937およびEP-A-422938(Merck)に記載されている)またはGB 9700699.3に記載されているような他のベクターを包含することができる。そのような特別なベクターもまた、選択された標的器官、組織、細胞もしくは細胞群、または哺乳類の身体の他の位置においてインビボで自然に濃縮される全ての分子から選択することができる。これらは、アミノ酸、オリゴペプチド(例えばヘキサペプチド)、分子認識単位(MRIF's)、単一鎖抗体(SCA's)、タンパク質、非ペプチド性有機分子、Fab断片および抗体を包含し得る。部位特定分子の例には、多糖類(例えば、CCGおよびヘキサペプチド)、タンパク質(レクチン、アシアロフェクチン、ポリクローナルIgG、血液凝固タンパク質(例えばヒルジン)、リボタンパク質および糖タンパク質など)、ホルモン、増殖因子、凝固因子(PF4など)、重合フィブリン断片(例えば、E₁)、血清アミロイド前駆体(SAP)タンパク質、低密度リポタンパク質(LDL)前駆体、血清アルブミン、無傷の赤血球の表面タンパク質、エストロゲンなどの受容体結合分子、ガラクトシルネオグリコアルブミン(NGA)(Vera等、Radiology 151:191(1984)を参照)、結合したガラクトサミンの変化する部材とのN-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HMPA)コポリマー(Duncan等、Biochim. Biophys. Acta 880:62(1986)を参照)、アリル並びに6-アミノヘキシルグリコシド(Wong等、

Carbo. Res. 170:27(1987)を参照)などの肝臓特異的タンパク質/ポリマー、およびフィブリンノーゲンが含まれる。部位特定タンパク質はまた、抗体とすることができる。抗体、特に抗体の抗原特異性の選択は、薬剤に対する特別に意図される標的部位によって決まる。モノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体に対して好ましい。所望の抗原と反応する抗体の調製は公知である。抗体製剤は、種々の起源から商業的に入手できる。フィブリン断片E₁は、Olexa等、J. Biol. Ch

em. 254:4925(1979)に記載されるように調製することができる。LDL前駆体およびSAPタンパク質の調製は、de Beer等、J. Immunol. Methods 50:17(1982)によって記載されている。上記の論文は、その全てにおいてここで引用することにより組み入れる。

そのような付加的なベクターを結合させ、血流中の薬剤の動きを遅くするが、これを止めないようにし、そして新脈管形成に関連する受容体部位に結合したときにその場所に留めるようにするのが特に好ましい。

ベクターを、例えば慣用の化学的連結技術を用いてリンカー部分または直接的にレポーター部分に結合させるために、ベクター化合物における官能基（例えばアミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基など）を用いることができる。

ベクターがペプチド化合物である場合、レポーターは多重レポーター、例えば金属化ポリキラント（好ましくは樹状ポリキラント）、磁性（好ましくは超常磁性）粒子、造影有効粒子または造影有効分子の溶液を含有する小胞、ポリイオン物質（例えば多数のイオン基、好ましくはアニオン基、例えばカルボン酸塩、リン酸塩またはスルホン酸塩のポリマー）である。

ベクターが非ペプチド性である場合、レポーターは多重レポーターとすることができ、または一つもしくは少数（例えば10個まで）の検出可能な標識、例えばキレート化常磁性金属イオン、共有結合もしくはキレート化ラジオアイソトープ、および発色団（例えば蛍光団）を含むことがで

きる。レポーターが共有結合した放射性核種であるかまたはこれを含む場合、トリチウムまたは¹⁴C原子よりヨウ素放射性核種であるのが好ましい。

リンカー

生分解性リンカーおよび生体高分子物質を包含する種々のリンカーを使用することができる。

造影剤のリンカー成分は、最も単純なものでベクターとレポーターの間の結合である。しかし、より一般的にはリンカーは、一つまたはそれ以上のベクターを一つもしくはそれ以上のレポーターに共有結合的または非共有結合的に連結させ

、共有結合的もしくは非共有結合的、例えば配位的にベクターおよびレポーター部分と結合する、またはそのような部分を封入、エントラップもしくは連結する組み込みもしくは付加基を有する、単一または複数の分子骨格、例えば線状、環状、枝分かれもしくは網状分子骨格、または分子状凝集物を与える。

レポーター単位の所望のベクターへの結合は、通常、レポーターおよび/またはベクター上に位置する官能基一つ以上との相互作用が関与している共有結合または非共有結合により達成される。このために使用することができる化学的反応性を有する官能基の例には、アミノ、ヒドロキシル、スルフィドリル、カルボキシルおよびカルボニル基、並びに炭水化物基、ビシナルジオール、チオエーテル、2-アミノアルコール、2-アミノチオール、ゲアニジニル、イミダゾリルおよびフェノール性の基が包含される。

従って、レポーターとベクターの共有結合カップリングはこのような官能基と反応できる反応性の部分を有する連結剤を用いて行なつてよい。スルフィドリル基と反応できる反応性部分の例にはX-CH₂-CO-型(式中X=Br、ClまたはI)の α -ハロアセチル化合物が包含され、これはスルフィドリル基に対して特別の反応性を示すが、Grud, F.R.N., Methods Enzymol.

(1967)11, 532に記載のとおりイミダゾリル、チオエーテル、フェノールおよびアミノ基を修飾するために使用することもできる。N-マレイミド誘導体もまたスルフィドリル基に対して選択性を有すると考えられているが、特定の条件下ではアミノ基へのカップリングにおいても有用である。結合がジスルフィド架橋の形成をとおして起こる場合は、アミノ基の変換によってチオール基を導入する、例えばTraut, R.等, Biochemistry (1973) 12, 3266に記載の2-アミノチオランのような試薬がスルフィドリル試薬と考えられる。即ち、レポーターまたはベクターの何れかに反応性のジスルフィド結合を導入する試薬が有用であるのは、結合がベクターとレポーターの間のジスルフィド交換によりもたらされるためであり; このような試薬の例にはEllman試薬(DTNB)、4,4'-ジチオジピリジン、メチルー3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィドおよびメチルー2-ピリジルジスルフィド(Kimura, T.等, Analyt. Biochem. (1982)122,271)が包含される。

アミノ基との反応が可能な反応性の部分の例にはアルキル化およびアシル化剤が含まれる。代表的なアルキル化剤を以下に示す。

i) 反応性チオール基の不存在下でアミノ基に対して特異性を示し、 $X-CH_2CO-$ (式中 $X=Cl, Br$ または I)の型の α -ハロアセチル化合物、例えば、Wong, Y-H, H., *Biochemistry* (1979) 24, 5337に記載のもの；

ii) マイケル型反応を介して、または、Smyth, D.G.等、*J. Am. Chem. Soc.* (1960)82, 4600および*Biochem. J.* (1964)91, 589に記載の環状カルボニル基への付加によるアシル化を介して、アミノ基と反応する N -マレイミド誘導体；

iii) 反応性のニトロハロ芳香族化合物のようなアリールハライド；

iv) McKenzie, J.A.等、*J. Protein Chem.* (1988)7, 581に記載のアルキルハライド；

v) アミノ基とのシッフ塩基形成が可能なアルデヒドおよびケトンで

あり、形成した付加物は通常還元により安定化されて安定なアミンとなるもの；

vi) アミノ、スルフィドリルまたはフェノール性ヒドロキシル基と反応するエピクロロヒドリンおよびビスオキシランのようなエポキシド誘導体；

vii) アミノ、スルフィドリルまたはヒドロキシル基のような親核物質に対して高い反応性を有する s -トリアジンの塩素含有誘導体；

viii) 開環によりアミノ基のような親核物質と反応する、例えばRoss, W.C.J., *Adv. Cancer Res.* (1954)2, 1に記載されているもののような、上記した s -トリアジン化合物系のアジリジン；

ix) Tietze, L.F., *Chem. Ber.* (1991)124, 1215に記載のスクワリク (squaric) 酸ジエチルエステル；および

x) 例えばBenneche, T.等、*Eur. J. Med. Chem* (1993) 28, 463に記載したもののような、エーテル酸素原子により誘発された活性化のためにノルマルアルキルハライドよりも反応性の高いアルキル化剤である α -ハロアルキルエーテル。

代表的なアミノ反応性アシル化剤の例には以下のものが含まれる。

i) Schlick, A.F.等、*J. Biol. Chem.* (1961)236, 2477に記載したもののような、安定な尿素およびチオ尿素誘導体をそれぞれ形成し、蛋白交叉結合のために

使用されているイソシアネートおよびイソチオシアネート、特に芳香族誘導体；

ii) Herzig, D.J.等、Biopolymers (1964) 2, 349に記載した、そして、リンカーへの蛍光レポーター基の導入のために有用であるスルホニルクロリド；

iii) 酸ハロゲン化物；

iv) ニトロフェニルエステルまたはN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルのような活性エステル；

v) 混合無水物、対象無水物またはN-カルボキシ無水物のような酸無水物；

vi) Bodansky, M.等、Principles of Peptide Synthesis (1984) Springer-Verlagに記載したようなアミド結合形成のための他の有用な試薬；

vii) 例えばWetzel, K.等、Anal. Biochem. (1974) 58, 347に記載したような、アジド基が亜硝酸ナトリウムを用いて予め形成されたヒドラジド誘導体から形成されるアシルアジド；

viii) 例えばRasmussen, J.K.等、Reactive Polymers (1991) 16, 199に記載したような、ビスアクリルアミドのような重合体に結合したアズラクトン；および、

ix) 例えばHunter, M.J. およびLudwig, M.L., J. Am. Chem. Soc. (1962) 84, 3491に記載したようなアミノ基との反応により安定なアミジンを形成するイミドエステル。

アルデヒド官能基のようなカルボニル基は親核蛋白側鎖官能基がプロトン化されるようなpHで弱塩基と反応させてよい。弱塩基には、例えばRatner, S.等、J. Am. Chem. Soc. (1937) 59, 200に記載のようなアルデヒド基を有する安定な5員チアゾリジン環を選択的に形成するN-末端システイン残基中に認められるような1,2-アミノチオールが包含される。フェニルヒドラゾンのような他の弱塩基も、例えばHeitzman, H.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71, 3537に記載のとおり、使用することができる。

アルデヒドおよびケトンまたはアミンと反応させて Schiff 塩基を形成してよく、これは還元的アミノ化により好都合に安定化してよい。アルコキシルアミノ部分は例えばWebb, R.等、Bioconjugate Chem. (1990) 1, 96に記載のとおり、ケト

ンおよびアルデヒドと容易に反応して安定なアルコキシアミンを生成する。

カルボキシル基との反応が可能な反応性の部分の例には、ジアゾセテートエステルおよびジアゾセトアミドのようなジアゾ化合物が包含され、これらは、例えばHerriot R.L., Adv. Protein Chem. (1947)3, 169に記載のとおり、高い選択性で反応してエステル基を生成する。O-アシル尿素形成、次いでアミド結合形成を介して反応するカルボジイミドのようなカルボン酸修飾試薬もまた有用に使用され；連結はアミンの添加を通じて促進してよく、あるいは、直接ペクター—受容体カップリングを行なってよい。有用な水溶性カルボジイミドには例えばZot, H.G.およびPuett, D. がJ. Biol. Chem. (1989)264, 15552に記載のとおり、1—シクロヘキシル—3—(2—モルホリニル—4—エチル)カルボジイミド(CMC)および1—エチル—3—(3—ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)が包含される。他の有用なカルボン酸修飾試薬にはイソキサゾリウム誘導体、例えばWoodwards試薬K；クロロホルメート、例えばp—ニトロフェニルクロロホルメート；カルボニルジイミダゾール、例えば1,1'—カルボニルジイミダゾール；およびN—カルボアルコキシジヒドロキノリン、例えばN—(エトキシカルボニル)—2—エトキシ—1,2—ジヒドロキノリンが包含される。

他の潜在的に有用な反応性の部分には、例えばWagner等がNucleic acid Res. (1978)5, 4065に記載のとおりグアニジン基と反応させるために用いてよいp—フェニレンジグリオキサールのようなビシナルジオン；および、例えばIshizaka, K.およびIshizaka T.がJ. Immunol. (1960)85, 163に記載のとおり、親電子置換反応を起こすジアゾニウム塩が包含される。ビスジアゾニウム化合物は酸性溶液中亜硝酸ナトリウムでアリールジアミンを処理することにより容易に調製される。レポーターおよび／またはペクター中の官能基は、当然ながら、例えば別の反応性または選択性を与えるために、所望により他の官能基に変換した後に反応させることができる。このために有用な方法の例には、ジカルボン酸無水物のような試薬を用い

たアミンからカルボン酸への変換；N—アセチルホモシステインチオラクトン、

無水S-アセチルメルカプトコハク酸、2-イミノチオランまたはチオール含有スクシンイミジル誘導体のような試薬を用いたアミンからチオールへの変換； α -ハロアセテートのような試薬を用いたチオールからカルボン酸への変換；エチレンジアミンまたは2-プロモエチルアミンのような試薬を用いたチオールからアミンへの変換；カルボジイミド次いでジアミンのような試薬を用いたカルボン酸からアミンへの変換；およびトシルクロリドのような試薬を用い、次いでチオアセテートとのエステル交換および酢酸ナトリウムを用いたチオールへの加水分解によるアルコールからチオールへの変換が包含される。

ベクター-レポーターカップリングはまた長さゼロレングスの連結剤として酵素を用いて行ってもよく；即ち、例えば、トランスグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼおよびキサンチンオキシダーゼを用いて架橋生成物を得ることができる。逆蛋白分解もまたアミド架橋の形成を介した架橋のために用いることができる。

非共有結合ベクター-レポーターカップリングは例えば安定な金属複合体の形態のキレート形成を介して、または、高親和性結合相互作用を介して、静電荷相互作用により行うことができる。

膜挿入を媒介することのできる要素を含むペプチド、リポ-オリゴ糖またはリポペプチドリンカーと結合するベクターもまた有用である。一つの例は、Leenhouts, J.M.等のFebs Letters(1995)370(3), 189-192に記載されている。

カップリングはまたアビジンまたはストレプトアビジンを用いて行なってよく、これらはビオチンに対する高親和性結合部位4個を有している。従ってアビジンは、ベクターとレポーターが共にビオチニル化されている場合にベクターをレポーターにコンジュゲートするために使用される。その例はBayer, E.A.およびWilchek, M.のMethods Biochem. Anal. (1980)

26, 1に記載されている。この方法は、薬剤の結合を促進し、結果として効果を潜在的に増大させ得る過程である、レポーターとレポーターとの連結を包含することを意図してもよい。また、アビジンまたはストレプトアビジンをレポーター粒子の表面に直接結合させることもできる。

非共有結合カップリングもまた二重特異性免疫グロブリンの二官能性の性質を

利用してよい。これらの分子は2個の抗原に特異的に結合できるため、これらを連結できる。例えば、二重特異性のIgGまたは化学的に構築された二特異性のF(ab)₂フラグメントのいずれかを連結剤として用いることができる。ヘテロ二官能性二重特異性抗体もまた、例えばBode, C.等, J. Biol. Chem. (1989)264, 944およびStaerz, U.D.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83, 1453に記載のとおり、二種の異なる抗原に連結することが報告されている。同様に、二種以上の抗原決定基を有するレポーターおよび／またはベクター (Chen, Aa等, Am. J. Pathol. (1988)130, 216等) を抗体分子と交叉結合させ、潜在的に効果が向上した式Iの薬剤の交叉結合構造体を形成させることができる。

(例えばカルボジミドを用いるか、または酵素により誘導されたアミド結合の形成の場合のように) 別の連結物質を導入することなく二つの反応性の化学性基を直接共有結合するいわゆるゼロレンジの連結剤は、所望により、非共有結合レポーター-ベクターの結合を誘導するビオチン/アビジン系のような剤および静電相互作用を誘導する剤の場合のように本発明により使用することができる。

しかしながら、最も一般的には、連結剤はスパーサー要素により連結された、例えば上記したような二種以上の反応性の部分を有する。このようなスパーサーの存在により、二官能性のリンカーは分子内または二種の異なる分子間の特定の官能基と反応することができ、これにより、これら二成分間の結合が起こり、レポーター-ベクターコンジュゲート内に外来性のリンカー由来物質が導入される。連結剤中の反応性の部分は同じ (ホモ

二官能性物質) かまたは異なって (ヘテロ二官能性物質または数種の異なる反応性の部分が存在する場合はヘテロ多官能性物質) いてよく、これにより分子内または分子間の何れの化学種の間も共有結合できる多様な試薬が得られる。

連結剤により導入される外来性物質の性質は、標的設定能力および最終生成物の全般的安定性に対し、重要な関連性を有している。従って、例えば生物分解性または化学的に感受性が高いか、または、酵素切断部位を有するスパーサーアームを含む不安定な連結を導入することが望ましい。あるいは、スパーサーは、例

えば界面活性剤として機能し、剤の安定性を向上させるために重合体成分を含んでもよい。スパーサーはまた、表面の交叉結合を増強させるために例えば上記したような反応性の部分を含んでいてもよい。

スパーサー要素は典型的には、距離5〜30Åでリンカーの反応部分を効果的に分離する脂肪族鎖よりなる。これらはポリ(エチレングリコール)のような巨大分子構造を有する。このような重合体構造は以後PEGと称するが、これは生物工学および生物医学の用途において大きく注目されている(例えばMilton Harris, J. (ed), "Poly (ethylene glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications", Plenum Press, New York, 1992参照)単純な天然のポリエーテルである。PEGは水などのほとんどの溶媒中に可溶であり、2または3個の水分子が各エチレングリコールセグメントに結合しながら水性条件で高度に水和しており；これは他の重合体または蛋白のPEG修飾表面への吸着を阻止する作用を有する。PEGは非毒性であり活性蛋白または細胞に対して無害であることが判っており、また共有結合PEGは非免疫原性および非抗原性であることが判っている。PEGは更に、その化学特性に殆ど影響することなく容易に修飾し他分子に結合することができる。その好都合な溶解性と生物学特性はPEGおよびPEG-ポリウレタンおよびPEG-ポリプロピレンのようなブロック共重合体を含むその共重

合体の用途が広いことから明らかである。

本発明で使用するPEGスパーサーの適切な分子量は例えば120ダルトン〜20kダルトンである。

網内系(RES)細胞による粒子の取り込みの主要な機序は血中の血漿蛋白によるオプソニン作用であり；これらがマークした外来性粒子が次いでRESに取り込まれる。本発明で使用するPEGスパーサー要素の生物学的性質はPEG化されたリポソームで観察されるものと同様の造影剤循環時間を延長させることである(例えばKlibanov, A.L.等、FEBS Letters (1990) 268, 235-237およびBlume, G. およびCevc, G. Biochim. Biophys. Acta (1990) 1029, 91-97参照)。

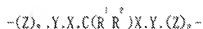
対象となる領域へのカップリング効率の増強はまたPEGスパーサーの末端に結合した抗体を用いて行ってもよい(例えばMaruyama, K.等、Biochim. Biophys. Act

a (1995) 1234, 74-80およびHansen, C.B.等、Biochim. Biophys. Acta (1995) 1239, 133-144参照)。

他の代表的なスパーサー要素には、構造型多糖類、例えばポリガラクトロン酸、グリコサミノグリカン、ヘパリノイド、セルロースおよび水産多糖類、例えばアルギネート、キトサンおよびカラギーナン；保存型多糖類、例えば澱粉、グリコーゲン、デキストランおよびアミノデキストラン；リジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸のホモおよびコポリマーの場合のように、ポリアミノ酸およびそのメチルおよびエチルエステル；および酵素切断部位を有するかまたは有しないポリペプチド、オリゴ糖およびオリゴヌクレオチドが包含される。

一般的にスパーサー要素はビニルグリコール、アゾ、スルホン、エステル、チオエステルまたはジスルフィド基のような切断可能な基を有する。

下記式：



〔式中、XおよびZは-O、-Sおよび-RR-（Rは水素または有機性の基）

から選択され；Yは各々カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、スルホリルまたは同様の酸形成基であり；mおよびnは各々0または1であり；そしてR¹およびR²は各々、水素、有機性の基または基-X-Y-(Z)_mであるか一緒になって2個の有機性の基を形成する〕の生物分解性メチレンジエステルまたはジアミド基含有のスパーサーも有用であり；例えばWO-A-9217436に記載のとおり、このような基は例えばin vivoでエステラーゼの存在下容易に生物分解されるが、このような酵素の非存在下では安定である。従ってこれらは、好都合に治療薬と結合させてその放出を遅延させることができる。

ポリ〔N-(2-ヒドロキシエチル)メタクリルアミド〕は細胞および組織との相互作用の程度が低いと潜在的に有用なスパーサー物質である(例えばVolfova, I., Rihova, B. およびV. R. およびVetvicka, P., J. Bioact. Comp. Polymers (1992) 7, 175-190参照)。主として密接に関連する2,3-ヒドロキシプロピル誘導体よりなる類似の重合体に関する研究によれば、更に低い程度までのみ単核食細胞系によりエンドサイトーシスは低い程度にしか起こらないことが判っ

ている(Goddard, P., Williamson, I., Bron, J., Hutchinson, L. E., Nicholas, J. およびPetrak, K., J. Bioc. Comp. Polym. (1991)6, 4-24参照)。

他の潜在的に有用な重合体スパーサー物質には以下のものが包含される。

i) メチルメタクリレートとメタクリル酸の共重合体、即ち浸潤崩壊可能であり(Lee, P.I., Pharm. Res. (1993)10, 980参照)、カルボキシレート置換基は中性の重合体と比較してより高い水準の膨潤を起こすもの；

ii) ポリメタクリレートと生物分解性ポリエステルブロック共重合体(例えばSan Roman, J. およびGuillen-Garcia, P., Biomaterials (1991) 12, 236, 241参照)；

iii) シアノアサクリレート、即ち、2-シアノアクリル酸のエステルの重合体で、生物分解性であり、選択的薬物デリバリーのためにナノ粒子の形態で使用されているもの(Forestier, F., Gerrier, P., Chaumard, C., Quero, A.M., Couvreur, P. およびLabarre, C., J. Antimicrob. Chemoter. (1992)30, 173-179参照)；

iv) 水溶性で一般的に生体適合性であると考えられているポリビニルアルコール(例えばLanger, R., J. Control. Release (1991) 16, 53-60参照)；

v) 生物浸潤崩壊性であるとされているビニルメチルエーテルと無水マレイン酸との共重合体(Finne, U., Hannus, M. およびUrtti, A., Int. J. Pharma. (1992)78, 237-241参照)；

vi) 腎臓で急速に濾過される例えば分子量約25,000未満のポリビニルピロリドン(Hespe, W., Meier, A.M. およびBlankwater, Y.M., Arznei.-Forsch./Drug Res. (1977)27, 1158-1162参照)；

vii) グリコール酸、乳酸、酪酸、吉草酸およびカブロン酸のような短鎖脂肪酸ヒドロキシ酸の重合体および共重合体(例えばCarli, F., Chim. Ind. (Milan) (1993) 75, 494-9参照)(分解速度を高めるために芳香族ヒドロキシ酸を配合した共重合体を包含する)(Imasaki, K., Yoshida, M., Fukuzaki, H., Asano, M., Kumakura, M., Mashimo, T., Yamanaka, H. およびNagai, T. のInt. J. Pharm. (1992)81, 31-38参照)；

viii) 非分解性であるが生体適合性の高いDacron(登録商標)のようなエチレングリコールとテレフタル酸の交互単位よりなるポリエステル；

ix) 脂肪族ヒドロキシ酸重合体の生物分解性セグメントを有するブロック共重合体(例えばYounes, H., Nataf, P.R., Cohn, D., Appelbaum, Y.I., Pizov, G., およびUretzky, G., *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* (1988) 16, 705-719参照)、例えばポリウレタンと組み合わせたもの(Kobayashi, H., Hyon, S.H., およびIkada, Y., "Water-curable and

biodegradable prepolymers" -*J. Biomed. Mater. Res.* (1991)25, 1481-1494参照)；

x) 移植片中で許容性の高いことが判っており、例えばポリ(テトラメチレングリコール)、ポリ(プロピレングリコール)またはポリ(エチレングリコール)を含有する可撓性の「ソフト」セグメントおよび例えば4,4'-メチレンビス(フェニレンイソシアネート)を含有する芳香族「ハード」セグメントと組み合わせるポリウレタン(例えばRatner, B.D., Johnston, A.B. およびLenk, T.J., *J. Biomed. Mater. Res:Applied Biomaterials* (1987) 21, 59-90;Sa Da Costa, V.等, *J. Coll. Inter-face Sci.* (1981)80, 445-452およびAffrossman, S.等, *Clinical Materials* (1991) 8, 25-31参照)；

xi) 加水分解性エステル結合のために生物分解性エステルであると考えられており(例えばSong, C. X., Cui, X. M. およびSchindler, A., *Med. Biol. Eng. Comput.* (1993)31, S147-150参照)、吸収性を向上させるためにグリコリド単位を含んでよい(Bezwada, R.S., Shalaby, S.W. およびNewman, H.D.J., *Agricultural and synthetic polymers: Biodegradability and utilization* (1990) (ed Glass, J.E. およびSwift, G.), 167-174-ACS symposium Series, #433, Washington D.C., USA-American Chemical Society)ポリ(1,4-ジオキサン-2-オン)；

xii) ウサギ(Brem, H., Kader, A., Epstein, J.I., Tamargo, R.J., Domb, A., Langer, R. およびLeong, K.W., *Sel. Cancer Ther.* (1989)5, 55-65参照)およびラット(Tamargo, R.J., Epstein, J.I., Reinhard, C.S., Chasin, M. およ

びBrem, H., J. Biomed. Mater. Res. (1989)23, 253-266)における試験で明らかな毒性作用を伴うことなく薬物の脳内制御放出に有用であることが判っているセバシン酸(オクタンジ酸)とビス(4-カルボキシーフェノキシ)プロパンの共重合体のようなポリ無水物;

x iii) in vivoの制御放出のために用いられているオルトエステル基を有する生物分解性重合体(Maa, Y.F. およびHeller, J., J. Control. Release (1990) 14, 21-28);および、

x iv) 交互に存在するリンおよび窒素原子よりなる無機重合体であるポリホスファゼン(Crommen, J.H., Vandorpe, J. およびSchacht, E.H., J. Control. Release (1993) 24, 167-180参照)。

以下の表は本発明の標的設定造影剤を調製する際に有用な連結剤を列挙したものである。

ヘテロ二官能性連結剤

連結剤	反応性 1	反応性 2	備 考
ABH	炭水化物	光反応性	
ANB-NOS	-NH ₂	光反応性	
APDP(1)	-SH	光反応性	ヨウ素化可能ジスルフィドリンカー
APG	-NH ₂	光反応性	pH 7～8 でArgと選択に反応
ASIB(1)	-SH	光反応性	ヨウ素化可能
ASBA(1)	-COOH	光反応性	ヨウ素化可能
EDC	-NH ₂	-COOH	ゼローレングスリンカー
GWBS	-NH ₂	-SH	
スルホーGWBS	-NH ₂	-SH	水溶性
HSAB	-NH ₂	光反応性	
スルホーHSAB	-NH ₂	光反応性	水溶性
WBS	-NH ₂	-SH	
スルホーWBS	-NH ₂	-SH	水溶性
W ₂ C ₂ H	炭水化物	-SH	
WPH	炭水化物	-SH	
NHS-ASA(1)	-NH ₂	光反応性	ヨウ素化可能
スルホーNHS-ASA(1)	-NH ₂	光反応性	水溶性、ヨウ素化可能
スルホーNHS-LC-ASA(1)	-NH ₂	光反応性	水溶性、ヨウ素化可能
PDPH	炭水化物	-SH	ジスルフィドリンカー
PMP-OTP	-NH ₂	光反応性	
SADP	-NH ₂	光反応性	ジスルフィドリンカー
スルホーSADP	-NH ₂	光反応性	水溶性ジスルフィドリンカー
SAED	-NH ₂	光反応性	ジスルフィドリンカー
SAND	-NH ₂	光反応性	水溶性ジスルフィドリンカー

連結剤	反応性 1	反応性 2	備 考
SANPAH	-NH ₂	光反応性	
スルホ-SANPAH	-NH ₂	光反応性	水溶性
SASD(1)	-NH ₂	光反応性	水溶性ヨウ素化可能ジスルフィドリンカー
SIAB	-NH ₂	-SH	
スルホ-SIAB	-NH ₂	-SH	水溶性
SMCC	-NH ₂	-SH	
スルホ-SMCC	-NH ₂	-SH	水溶性
SMPB	-NH ₂	-SH	
スルホ-SMPB	-NH ₂	-SH	水溶性
SNPT	-NH ₂	-SH	
スルホ-LC-SNPT	-NH ₂	-SH	水溶性
SPDP	-NH ₂	-SH	
スルホ-SPDP	-NH ₂	-SH	水溶性
スルホ-LC-SPDP	-NH ₂	-SH	水溶性
スルホ-SAWCA(2)	-NH ₂	光反応性	
スルホ-SAPB	-NH ₂	光反応性	水溶性

注記：(1)＝ヨウ素化可能

(2)＝蛍光

ホモ二官能性連結剤

連結剤	反応性	備 考
BS	-NH ₂	
BMI	-SH	
BASED(1)	光反応性	ヨウ素化官能ジスルフィドリンカー
BSCOE	-NH ₂	
スルホ-BSCOE	-NH ₂	水溶性
DPDNB	-NH ₂	
DMA	-NH ₂	

連結剤	反応性	備 考
DMP	-NH ₂	
DMS	-NH ₂	
DPDPB	-NH ₂	ジスルフィドリンカー
DSG	-NH ₂	
DSP	-NH ₂	ジスルフィドリンカー
DSS	-NH ₂	
DST	-NH ₂	
スルホ-DST	-NH ₂	水溶性
DTBP	-NH ₂	ジスルフィドリンカー
DTSSP	-NH ₂	ジスルフィドリンカー
EGS	-NH ₂	
スルホ-EGS	-NH ₂	水溶性
SPBP	-NH ₂	

ビオチニル化剤

薬 剤	反応性	備 考
ビオチン-BMCC	-SH	
ビオチン-DPPE*		ビオチニル化リボソームの調製
ビオチン-LC-DPPE*		ビオチニル化リボソームの調製
ビオチン-BPDP	-SH	ジスルフィドリンカー
ビオチン-ヒドラジド	炭水化物	
ビオチン-LC-ヒドラジン	炭水化物	
ヨードアセチル-LC-ビオチン	-NH ₂	
NBS-イミノビオチン	-NH ₂	アビジンに対する親和性低下
NBS-SS-ビオチン	-NH ₂	ジスルフィドリンカー
光活性化性ビオチン	核酸	
スルホ-NBS-ビオチン	-NH ₂	水溶性
スルホ-NBS-LC-ビオチン	-NH ₂	

注記：DPPE＝ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン

LC＝長鎖

蛋白修飾のための薬剤

薬 剤	反応性	備 考
Ellman試薬	-SH	定量/検出/保護
DTT	-S, S-	還元
2-メルカプトエタノール	-S, S-	還元
2-メルカプトチラミン	-S, S-	還元
Traut試薬	-NH ₂	-SH基導入
SATA	-NH ₂	保護SH基導入
AMCA-NHS	-NH ₂	蛍光標識
AMCA-ヒドラジド	炭水化物	蛍光標識
AMCA-HPDP	-S, S-	蛍光標識
SBF-クロリド	-S, S-	-SH基の蛍光検出
N-エチルマレイミド	-S, S-	-SH基ブロック
NBS-アセテート	-NH ₂	-NH ₂ 基のブロックとアセチル化
無水シトラコン酸	-NH ₂	可逆ブロックと負電荷導入
DTPA	-NH ₂	キレート形成剤導入
BNPS-スカトール	トリプトファン	トリプトファン残基切断
Bolton-Hunter	-NH ₂	ヨウ素化基導入
p-ヨードフェニルアラニン		

すでに企図されている直鎖および分枝鎖PEG様リンカー(例えばエチレンオキシド反復単位2~100個を含有するポリエチレングリコール等)に加えて、VLR系でのリンカーは独立して化学的結合または連結基の残基であってよい。本文で使用される「連結基の残基」なる用語は、ベクター反応性基とベクター上の反応性部位との反応から残存しているか、結果として生じるかまたは誘導される部分を言うものとする。本文で使用される「ベクター反応性基」なる用語は、一般的にベクター上に存在している官能基と反応し得るいずれの基を言うものとし、この基の誘導体は最小限度でベクターの受容体への結合能力に影響するものである。しかしながら、この

ようなベクター反応性基は関連するタンパク質分子に典型的に存在している官能

基とも反応し得ることが具体的に意図されている。すなわち、一つの特徴によれば、本発明の実施化に有用なリンカーは、反応性基を含有する上述したベクターからなるいずれの関連分子（このような関連分子がタンパク質であってもなくても）と反応して連結基を形成し得る基から誘導される。

好ましい連結基は、限定するものではないが、次のものから選択されるベクター-反応性基から誘導される：

ベクター上で直接カルボキシ、アルデヒド、アミン（NH₂）、アルコール、スルフィドヒドリル基、活性化メチレン等と反応する基、例えば、活性ハロゲン含有基、例えば、クロロメチルフェニル基およびクロロアセチル〔ClCH₂C(=O)-〕基、活性化2-(脱離基で置換された)-エチルスルホニルおよびエチルカルボニル基例えば2-クロロエチルカルボニル；ビニルスルホニル；ビニルカルボニル；エポキシ；イソシアナト；イソチオシアナト；アルデヒド；アジリジン；スクシンイミドキシカルボニル；活性化アシル基例えばカルボン酸ハロゲン化物；混合無水物等。

ベクター-反応性基を含有する修飾ベクター分子と容易に反応し得る基、すなわち、例えばベクターをアルデヒドまたはカルボン酸に酸化することにより、上掲の表に記述した反応性基のような反応性基を含有するように修飾された反応性基を含有するベクターと容易に反応し得る基、この場合「連結基」はアミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、ヒドラジノ、アルキルヒドラジノ、アリールヒドラジノ、カルバジド、セミカルバジド、チオカルバジド、チオセミカルバジド、スルフィドヒドリル、スルフィドヒドリアルキル、スルフィドヒドリアルリール、ヒドロキシ、カルボキシ、カルボキシアルキルおよびカルボキシアリールから選択される反応性基から誘導することができる。前記連結基のアルキル部分は1乃至約20個の炭素原子を含有している。前記連結基のアリール部分は約6乃至約20個の炭素原子を

含有している；および

反応性基を含有するベクターまたは上述した修飾ベクターに架橋剤を用いて連結し得る基。ある種の有用な架橋剤、例えばホモ二官能性およびヘテロ二官能性